

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
17. April 2003 (17.04.2003)

PCT

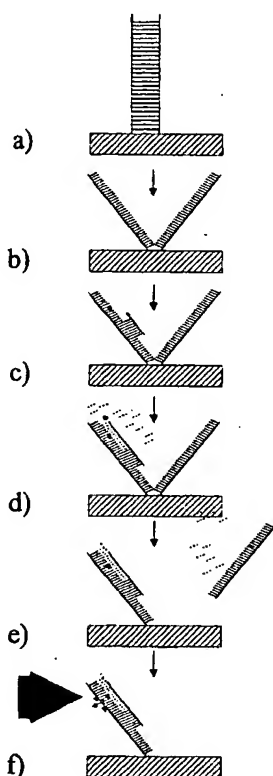
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/031649 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68 (72) Erfinder; und  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/03845 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt  
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).  
(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Oktober 2002 (04.10.2002) (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,  
10178 Berlin (DE).  
(25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch  
(30) Angaben zur Priorität:  
101 51 055.1 5. Oktober 2001 (05.10.2001) DE  
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,  
10435 Berlin (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DETERMINATION OF CYTOSINE METHYLATION IN CPG ISLANDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNG IN CPG-INSELN



(57) Abstract: A method for the determination of cytosine methylation in DNA samples is disclosed. The DNA is firstly extracted from the sample and bonded to a surface. In the second method step a genomic DNA sample is preferably treated with a bisulphite (= disulphite, hydrogen sulphite) in such a way that all non-methylated cytosine bases are converted to uracil, whilst the 5-methylcytosine bases remain unchanged. In the third method step one or several oligonucleotides are hybridised onto the treated DNA as primer. In the fourth method step the hybridised primer(s) are lengthened in a polymerase reaction. Marked guanine nucleotides are preferably used which are then essentially only incorporated when cytosine bases are still present in the treated DNA. Thereafter the measure of inclusion of guanine bases and thus the number of incorporated markings is proportional to the methylation in the sample under investigation. In the fifth method step the marked nucleotides not incorporated in the polymerase reaction are removed. In the sixth method step the number of markings in the fragment generated by the primary extension is approximately determined, whereby the signal intensity emitted by said markings is directly or indirectly measured.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben. Zuerst wird aus einer Probe die DNA extrahiert und an eine Oberfläche gebunden. Im zweiten Schritt wird eine genomische DNA-Probe bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosin-basen unverändert bleiben. Im dritten Verfahrensschritt hybridisiert man an die behandelte DNA ein oder mehrere Oligonukleotide als Primer. Im vierten Verfahrensschritt wird der oder werden die hybridisierten Primer in einer Polymerasereaktion verlängert. Dabei werden bevorzugt markierte Guaninnukleotide eingesetzt, die im wesentlichen nur dann eingebaut werden, wenn in der behandelten DNA noch Cytosinbasen vorlagen. Demnach ist das Ausmass des Einbaus der Guaninbasen und damit auch die Anzahl der eingebauten Markierungen proportional zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe. Im fünften Verfahrensschritt werden die in der Polymerasereaktion nicht eingebauten markierten Nukleotide entfernt. Im sechsten Schritt des Verfahrens wird die Anzahl der Markierungen in dem durch die Primerverlängerung erzeugten Fragment näherungsweise bestimmt, indem von diesen Markierungen ausgehende Signalintensitäten direkt oder indirekt gemessen werden.

WO 03/031649 A2



(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

### **Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in CpG Inseln**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum besonders empfindlichen Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben.

10 Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese.

25 Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

35 Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von

Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcyto-sin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällung- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 DEC 15;24(24):5064-6). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related

modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May 15;26(10):2255-64.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen  
5 (z. B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Dörfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines  
10 bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. Nat Genet. 1997 Nov.;17(3):275-6) oder einzelne  
15 Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalzo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic  
Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2529-31, WO-Patent  
20 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2532-4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99/28498).

25 Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids  
30 Res. 1998 Nov. 1;26(21):5009-10).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen  
35 Genen befassen, sind:

- Grigg G, Clark S. sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioassays*. 1994 Jun.;16(6):431-6, 431;
- Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Dörfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet*. 1997 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphate genomic sequencing. *Nucleic Acids Res*. 1994 Feb. 25;22(4):695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene*. 1995 May 19;157(1-2):261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.

- Ein weiteres bekanntes Verfahren ist die sogenannte methylierungssensitive PCR (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996), Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 3;93(18):9821-6). Für dieses Verfahren werden Primer verwendet, die entweder nur an eine Sequenz hybridisieren, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position unmethylierten DNA entsteht, oder aber umgekehrt Primer, welche nur an eine Nukleinsäure bindet, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position unmethylierten DNA entsteht. Mit diesen Primer können demnach Amplifikate erzeugt werden, deren Detektion wiederum Hinweise auf das Vorliegen einer methylierten oder unmethylierten Position in der Probe liefern, an welche die Primer binden.
- Ein neueres Verfahren ist auch der Nachweis von Cytosin-Methylierung mittels einer Taqman PCR, das als Methyl-

Light bekannt geworden ist (WO 00/70090). Mit diesem Verfahren ist es möglich, den Methylierungsstatus einzelner oder weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuweisen, so dass sich eine nachfolgende Analyse der Produkte erübrigt.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie Oligonucleotide bei vermindertem nichtspezifischen Hintergrundsignal entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoresziert markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct. 15;60(20):2299-301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ih-

rer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

- 5 MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren  
10 ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch  
15 die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es  
20 zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich  
25 durch einfache Alkylierungsschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die  
30 Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte  
35 Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.



Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie  
5 Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Nach der Erfindung der PCR sind in den folgenden Jahren zahlreiche Varianten bekannt geworden, die diese Technik  
10 zur Amplifikation der DNA verfeinern. Insbesondere ist hier die Multiplexierung der PCR (Multiplex-PCR) zu erwähnen, wobei man mehr als 2 spezifische Primer einsetzt und dabei in einem Reaktionsgefäß eine Vielzahl von verschiedenen, spezifischen Amplifikationen erzeugen kann.  
15 Besonders interessant ist auch die sogenannte Nested PCR, welche unter anderem zum Nachweis besonders geringer DNA Mengen verwendet wird. Diese Art der PCR besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationen, wobei die Primer der zweiten Amplifikation innerhalb des ersten Amplifikates  
20 liegen und nicht mit den Primern der ersten Amplifikation identisch sind. Dadurch wird eine besondere Spezifität erreicht, da die Primer der zweiten Amplifikation nur dann funktionieren, wenn in der ersten Amplifikation das beabsichtigte Fragment erzeugt wurde. Dagegen ist die  
25 die Vermehrung etwaiger Nebenprodukte der ersten Amplifikation in der zweiten so gut wie ausgeschlossen.

Es sind demnach bislang vielerlei Verfahren zur Methylierungsanalyse Stand der Technik. Die vorliegende Erfindung  
30 soll jedoch eine Möglichkeit zur Analyse des Methylierungsgrades insgesamt in einer CpG Insel bereitstellen. Dabei ist es bevorzugt nicht erforderlich, eine Polymerasereaktion durchzuführen, was die Durchführung des Verfahrens erleichtert. Es ist im Rahmen einer Methylierungsanalyse im Bereich der klinischen Diagnostik wesentlich,  
35 dass Untersuchungsergebnisse möglichst schnell zur Verfü-

gung gestellt werden können und dass sich der experimentelle Aufwand in möglichst engen Grenzen hält. Dazu ist das hier beschriebene Verfahren, welches das Ausmass der Methylierung in einer gesamten CpG Insel misst, in besonderem Masse geeignet. Im Gegensatz zu den meisten bislang beschriebenen Verfahren zur Methylierungsanalyse wird dabei nicht der Methylierungsstatus einer einzelnen oder mehrerer einzelner CpG Positionen bestimmt. In vielen Fällen wird dies auch keinen Vorteil bringen, da mitunter ganze Promotorregionen komethyliert vorliegen, das heisst viele aufeinanderfolgende CpG Positionen den gleichen Methylierungsstatus besitzen.

Die vorliegende Erfindung macht es sich nun zunutze, dass dieser Methylierungsstatus in zahlreichen zu untersuchenden Positionen als ähnlich angenommen wird und ein Signal erzeugt werden kann, welches aus der Summe dieser Einzelpositionen resultiert. Dies ermöglicht eine Empfindlichkeit, welche die Durchführung einer PCR Reaktion entbehrlich machen kann.

Auch macht es sich das Verfahren zunutze, dass Guaninbasen in Bisulfit behandelter DNA auf einem Strang nur dann in einer nachfolgenden Polymerasereaktion eingebaut werden, wenn in der entsprechenden genomischen DNA Probe ein methyliertes Cytosin vorlag. Enthält die Proben DNA an den betreffenden Positionen keine Methylierungen, so findet kein Einbau von Guanin in der Polymerasereaktion statt.

Umgekehrt, wenn in einer PCR-Reaktion zu der bisulfitbehandelten DNA auch ein Gegenstrang erzeugt wurde (nach der Bisulfitbehandlung sind die DNA Stränge der Probe nicht mehr wie ursprünglich komplementär), wird mit diesem Gegenstrang als Templat nur dann in einer nachfolgenden Polymerasereaktion ein Cytosin eingebaut, wenn ur-

spränglich in der entsprechenden genomischen DNA Probe ein methyliertes Cytosin vorlag.

5 Daraus folgt, dass nur dann Guanine respektive Cytosine eingebaut werden, wenn in der genomischen DNA Probe Methylierung vorlag. Das Ausmass des Einbaus der Guanine respektive Cytosine (je nach Verfahren, siehe oben) korreliert direkt mit dem Ausmass der Methylierung im jeweils untersuchten genomischen DNA Abschnitt.

10

Das erfindungsgemässe Verfahren besteht daher aus den folgenden Teilschritten:

15

Zuerst wird aus einer Probe die genomische DNA extrahiert und dabei bevorzugt an eine Oberfläche gebunden, besonders bevorzugt erfolgt diese Bindung durch Hybridisierung an ein immobilisiertes Oligonukleotid und wiederum besonders bevorzugt wird die genomische DNA vor der Bindung durch Restriktionsenzyme gespalten.

20

Erfindungsgemäss bevorzugt ist es, dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt.

25

Es ist weiterhin erfindungsgemäss bevorzugt, dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Augen, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.

30

Der enzymatische Schnitt der DNA wird besonders bevorzugt mit einer Restriktionsendonuklease oder mehreren unterschiedlichen Restriktionsenzymen ausgeführt. Werden mehrere Restriktionsendonukleasen verwendet, so hängt es von

35

den jeweiligen Puffern ab, ob diese nacheinander oder gleichzeitig zum Einsatz kommen. Dem Fachmann ist die Anwendung von Restriktionsenzymen gemäß den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen bekannt.

5

Im zweiten Schritt wird eine genomische DNA-Probe bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-

10

Methylcytosinbasen unverändert bleiben. Dies findet besonders bevorzugt an der Oberfläche statt, an die die Proben DNA im ersten Schritt bereits gebunden wurde.

15

Es ist ganz besonders erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die chemische Behandlung mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt. Bevorzugt ist es auch, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt. Es ist auch und weiterhin bevorzugt, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.

20

Im dritten Verfahrensschritt hybridisiert man an die behandelte DNA ein oder mehrere Oligonukleotide als Primer.

25

Im vierten Verfahrensschritt wird der oder werden die hybridisierten Primer in einer Polymerasereaktion verlängert. Dabei werden markierte Guaninnukleotide eingesetzt, die im wesentlichen nur dann eingebaut werden, wenn in der behandelten DNA noch Cytosinbasen vorlagen. Demnach ist das Ausmass des Einbaus der Guaninbasen und damit auch die Anzahl der eingebauten Markierungen proportional zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe. Besonders bevorzugt endet die Polymerasereaktion an der Position, die im ersten Schritt durch den Einsatz einer

30

35

Restriktionsendonuklease geschnitten wurde.

Im fünften Verfahrensschritt werden die in der Polymera-  
seraktion nicht eingebauten markierten Nukleotide ent-  
fernt. Besonders bevorzugt erfolgt dies durch einfache  
Waschschritte in dem Fall, dass die DNA an eine Oberflä-  
5 che gebunden vorliegt.

Im sechsten Schritt des Verfahrens wird die Anzahl der  
Markierungen in dem durch die Primerverlängerung erzeug-  
ten Fragment näherungsweise bestimmt, indem eine von die-  
10 sen Markierungen ausgehende Signalintensität direkt oder  
indirekt gemessen wird.

Aus der Signalintensität wird auf den Methylierungsstatus  
der DNA Probe in dem jeweils untersuchten Fragment ge-  
15 schlossen.

Markierungen können beispielsweise Fluoreszenz-  
markierungen, Radionuklide, oder abspaltbare Massenmar-  
kierungen sein, welche in einem Massenspektrometer nach-  
20 gewiesen werden. Es können jedoch auch Markierungen wie  
Peptide sein, die indirekt durch Bindung eines wiederum  
anders markierten Antikörpers nachgewiesen werden. Es  
sind auch chemische Markierungen denkbar, die durch nach-  
folgende Umsetzung mit einem wiederum anders markierten  
25 Markermolekül, welches zum Beispiel ein Fluoreszenzfarb-  
stoff sein kann, erst sichtbar gemacht werden können. Dem  
Fachmann sind vielerlei Möglichkeiten geläufig, Moleküle  
mit Markierungen zu versehen. Die hier aufgeführten Mög-  
lichkeiten sollen daher als Beispiele verstanden werden,  
30 und andere, dem Fachmann geläufige Möglichkeiten der Mar-  
kierung sollen als Bestandteil dieser Erfindung betrach-  
tet werden.

In den zuvor genannten Schritten wird auf die Amplifika-  
35 tion der behandelten DNA-Probe verzichtet. Das Verfahren  
ist daher vor allem dann anwendbar, wenn die Probenmenge

nicht limitierend ist und die verwendeten Markierungen mit hinreichender Empfindlichkeit nachweisbar sind. Da jedoch bei der Untersuchung beispielsweise einer CpG Insel nach dem oben beschriebenen Verfahren eine Vielzahl von Markierungen in der Polymerasereaktion eingebaut wird, wenn die CpG Insel methyliert vorlag, wird auch durch die Art des durchgeführten Verfahrens eine erhebliche Empfindlichkeitssteigerung erreicht.

Wird einer erhöhte Empfindlichkeit aufgrund einer nur geringfügigen DNA-Menge benötigt, so wird das oben beschriebene Verfahren durch eine PCR Reaktion oder eine andere nicht nur linear amplifizierende Polymerasereaktion ergänzt, welche nach der Behandlung gemäss dem zweiten Verfahrensschritt durchgeführt wird. Bevorzugt wird dabei die (chemisch) behandelte DNA-Probe unter Verwendung von bevorzugt mindestens 2 Primeroligonukleotiden mittels einer Polymerasereaktion amplifiziert, wobei bevorzugt eine hitzebeständige Polymerase, Nukleotide sowie ein geeigneter Reaktionspuffer, wie meist mit der Polymerase geliefert und dem Fachmann bekannt, verwendet werden.

Besonders bevorzugt ist es auch, die Amplifikationen mehrerer unterschiedlicher Fragmente mit mehr als 2 verschiedenen Primern in einem Reaktionsgefäß durchzuführen und damit die Amplifikationsschritte als Multiplex-PCR auszuführen. Es ist generell besonders bevorzugt, die Amplifikationen als Polymerasekettenreaktion auszuführen.

Soll weiterhin, auch unter Verwendung einer zusätzlichen PCR, an einer Oberfläche gearbeitet werden, so erfolgt entweder eine Festphasen-PCR in der Art, dass Primer für den PCR Schritt zusätzlich an die Oberfläche gebunden sind, oder es erfolgt nach der PCR bevorzugt ein Aufreinigungsschritt durch handelsübliche Aufreinigungskits (wie beispielsweise von den Firmen Promega oder Qiagen)

und nachfolgende Bindung des PCR Produktes an eine Oberfläche, an welcher nun die weitere Polymerasereaktion zum Einbau der Markierungen erfolgen soll.

- 5 Bevorzugt ist es, dass bei der Amplifikation einer der Primer an eine Festphase gebunden ist. Bei diesen Festphasen kann es sich beispielsweise um funktionalisierte Polymere, Metalle, Glas oder Halbleiter wie Silicium handeln. Das Anbinden der Primer erfolgt bevorzugt über bifunktionale Linkermoleküle, welche an eine silanisierte  
10 Oberfläche gebunden werden oder aber beispielsweise über Thioate im Primer oder Thiolmodifikationen an Bromacetyl-derivatisierte Oberflächen oder Gold.
- 15 In einer weiteren, bevorzugten alternativen Variante des Verfahrens erfolgt der Einbau der Markierungen selbst in einer PCR Reaktion. In diesem Fall findet die Reaktion bevorzugt ohne Bindung der Primer an eine Festphase statt. Stattdessen erfolgt eine Abtrennung des PCR Produktes, beispielsweise durch Gelelektrophorese, von anderen Nebenprodukten und Edukten. Die Intensität der von den Markierungen ausgehenden Signale in den so erhaltenen Banden oder Bandenmustern wird bestimmt und so auf den  
20 Methylierungsgrad in dem untersuchten Fragment der Proben DNA geschlossen.
- 25

Wird auch in einer Amplifikation der komplementäre Gegenstrang zu den behandelten DNA Fragmenten erzeugt, so entsprechen in diesem Gegenstrang im Falle einer Behandlung mit einem Bisulfit Adenin einer nicht methylierten Cytosinposition und Guanin einer methylierten Cytosinposition in der DNA-Probe. Daher ist es nach Amplifikation auch  
30 möglich, das Verfahren sinngemäß auch mit einem markierten Cytosin auszuführen.

Die in den Polymerasereaktionen verwendeten Primer amplifizieren besonders bevorzugt keine Fragmente aus nicht mit Bisulfit behandelte genomische DNA (oder nur in vernachlässigbarem Ausmaß), so dass sie für die mit Bisulfit umgewandelte DNA spezifisch sind. Dies schützt vor fehlerhaften Ergebnissen im Falle einer unvollständigen Umwandlungsreaktion mit beispielsweise Natriumbisulfit.

Bevorzugt ist es ferner, dass die Analyse mittels Hybridisierung an Oligomer-Arrays erfolgt, wobei Oligomere Nukleinsäuren oder in ihren Hybridisierungseigenschaften ähnliche Moleküle wie PNAs sein können.

Es ist bevorzugt, dass der Methylierungsstatus von mehr als 10 Methylierungspositionen der zu analysierenden DNA in einem Experiment nachgewiesen wird.

Auch ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Analyse durch zusätzliche Längenmessung der amplifizierten zu untersuchenden DNA erfolgt, wobei Methoden zur Längenmessung Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese, Chromatographie (z.B. HPLC), Massenspektrometrie und andere geeignete Methoden umfassen. Die Fragmente werden dabei über die in der Polymerasereaktion eingebauten Markierungen detektiert.

Weiterhin ist bevorzugt, dass man aus dem Methylierungsgrad an einzelnen oder mehreren verschiedenen untersuchten CpG Inseln auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten schließt.

Bevorzugt werden die Markierungen entweder durch eine Markierung der Nukleotide während der Polymerasereaktion oder Amplifikation in die erzeugten markierten Fragmente eingebracht.



Weiterhin besonders vorteilhaft ist es, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind oder/und dass die Markierungen Radionuklide sind oder/und dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem  
5 Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es auch, dass die Fragmente insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.  
10 Dabei trägt jede eingebaute Markierung eine für die Methylierung spezifisch zusätzliche Masse bei, so dass aus der gemessenen Molekülmasse auf die Anzahl der Methylierungen in der CpG Insel geschlossen werden kann.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien an-  
20 gehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen;  
25 Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität  
30 und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit;  
35 Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Vorteilhaft ist dabei die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

- 5     Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, Primern für die Polymerasereaktion, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Assays. Zusätzlich ist auch eine Mikrotiterplatte, die für die Immo-
- 10     bilisierung der Proben-DNA eine aktivierte Oberfläche besitzt und in der auch nachfolgende Reaktionsschritte ausgeführt werden können, bevorzugter Bestandteil dieses Kits.
- 15     Das erfindungsgemäße Verfahren besteht demnach aus den folgenden Teilschritten:
- a) aus einer Probe wird DNA extrahiert,
- 20     b) die DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit), derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,
- 25     c) ein oder mehrere Oligonukleotidprimer werden an die behandelte DNA hybridisiert,
- d) die hybridisierten Primer werden in einer Polymerasereaktion verlängert, wobei markierte Nukleotide im wesentlichen nur dann eingebaut werden, wenn in der behandelten DNA nach Schritt b) noch Cytosinbasen vorlagen und wobei das Ausmass des Einbaus der markierten Nukleotide zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe
- 30     korreliert,
- 35

e) die in der Polymeraseraktion nicht eingebauten markierten Nukleotide werden entfernt,

5 f) die Anzahl der Markierungen in dem durch die Primerverlängerung erzeugten Fragment wird näherungsweise bestimmt, indem eine von diesen Markierungen ausgehende Signalintensität gemessen wird.

10 Besonders bevorzugt ist es, dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt.

15 Besonders bevorzugt ist es, dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.

20 Es ist zudem besonders bevorzugt, dass man die Behandlung nach Anspruch 1b) mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt. Besonders bevorzugt ist auch, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose oder besonders bevorzugt nach Bindung der DNA an eine  
25 Oberfläche erfolgt. In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante ist bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen.

30 Es ist zudem besonders bevorzugt, dass aus einer Probe genomische DNA extrahiert wird und dabei an eine Oberfläche gebunden wird. Besonders bevorzugt ist es auch, dass diese Bindung durch Hybridisierung an ein immobilisiertes  
35 Oligonukleotid erfolgt. Es ist zudem bevorzugt, dass die

extrahierte DNA vor der Bindung durch Restriktionsenzyme gespalten wird.

5 In einer besonders bevorzugten Verfahrensausführung hybridisiert man an die behandelte DNA mehrere verschiedene Oligonukleotide als Primer.

10 Besonders bevorzugt werden die markierten Nukleotide Guaninderivate sind, wobei diese in der Polymerasereaktion nur dann wesentlich eingebaut, wenn in der DNA Probe an den entsprechenden Positionen Cytosin-Methylierung vorlag. Zudem ist bevorzugt, dass das Ausmaß des Einbaus der Guaninbasen und damit auch die Anzahl der eingebauten Markierungen proportional ist zu der Methylierung in der zu  
15 untersuchenden DNA-Probe.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante endet Polymerasereaktion bevorzugt an der Position, die vor der DNA Isolierung durch den Einsatz einer Restriktions-  
20 endonuklease geschnitten wurde.

In einer weiteren bevorzugten Verfahrensvariante werden die in der Polymerasereaktion nicht eingebauten markierten Nukleotide durch Waschschriffe entfernt und die DNA liegt  
25 an eine Oberfläche gebunden vor.

Die Markierungen sind bevorzugt Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide, Chemilumineszenzmarkierungen oder abspaltbare Massenmarkierungen sind, welche in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. Es ist auch bevorzugt, dass die Markierungen indirekt durch Bindung eines wiederum anders markierten Antikörpers nachgewiesen werden.  
30

35 In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die behandelte DNA-Probe unter Verwendung

von bevorzugt mindestens zwei Primeroligo-nukleotiden vorzugsweise mittels einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert. In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante sind die markierten Nukleotide Cytosinderivate, wobei diese in der Polymerasereaktion nur dann wesentlich eingebaut werden, wenn in der DNA Probe an den entsprechenden Positionen Cytosin-Methylierung vorlag.

10 Bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man die Amplifikation mehrerer Fragmente in einem Reaktionsgefäß in Form einer Multiplex-PCR durchführt.

15 In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird mindestens einer der Amplifikationen einer der jeweiligen Primer an eine Festphase gebunden.

Verfahren nach einem der voranstehenden, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines der beschriebenen Verfahren zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verlet-

zung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonva-  
leszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Kör-  
pers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion,  
Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bin-  
degewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische  
5 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen  
oder sexuelle Fehlfunktion.

Ebenfalls Erfindungsgegenstand ist die Verwendung eines  
10 Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur  
Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Unter-  
suchung der Zelldifferenzierung.

Kurzbeschreibung der Figuren

15

Fig. 1 erläutert ein besonders bevorzugte Variante der  
Erfindung:

a) enzymatisch geschnittene Proben-DNA wird an eine Ober-  
20 fläche gebunden und dabei von Begleitmaterial abgetrennt

b) die an die Oberfläche gebundene DNA wird denaturiert  
und anschliessend beispielsweise mit einem Bisulfit che-  
misch behandelt

25

c) ein Primer wird an die DNA gebunden

d) eine enzymatische Primerextensionsreaktion (Nukleotide  
dargestellt als gestrichelte Linien: ---) wird durchge-  
30 führt, und es werden nur dann Markierungen eingebaut,  
wenn zuvor in der Proben-DNA an den betreffenden Positio-  
nen Cytosin-Methylierungen (\*) vorlagen

e) die übrigen markierten Nukleotide und Reaktionskompo-  
35 nenten werden in einem Waschschrift entfernt

f) die Fluoreszenzintensität ausgehend von den eingebauten Markierungen wird gemessen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

5

**Beispiel 1:**

Bisulfit-Behandlung von DNA an festen Oberflächen

Im folgenden werden zwei Verfahren beschrieben, um DNA an einer festen Phase zu binden:

## 10 a) Verwenden von Reaktionsgefäßen

Für die Anbindung von DNA auf die Oberfläche der Reaktionsgefäße wurde EcoR1 geschnittene genomische DNA (Promega) verwendet. 160ng wurden in die entsprechenden Reaktionsgefäße pipettiert, mit Wasser auf ein Gesamtvolumen  
15 von 20µl aufgefüllt, auf einem Shaker kurz gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Gefäße zweimal mit 50µl Wasser gewaschen. Um die Aktivität der verbleibenden Bindungsstellen auf der Tubeoberfläche herabzusetzen, wurden  
20 10µl einer 5%igen Bovin-Serum-Albumin Lösung hinzu pipettiert, mit 40µl Wasser aufgefüllt und ebenfalls bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Abschließend wurde das Gefäße einmal mit 50µl Wasser gewaschen.

## 25 Bisulphit Behandlung:

Die angebundene DNA wird bei 96°C für 20 Minuten in einem Eppendorf-Mastercycler denaturiert. Für die Bisulfitreaktion wurde eine Natriumbisulfit-Lösung verwendet. Die Reaktionsgefäße wurden bei 50°C in einem Eppendorf-  
30 Mastercycler für fünf Stunden inkubiert. Nach erfolgter Bisulfitreaktion wurde die Lösung herauspipettiert und die Gefäße mit Wasser und, vorbereitend auf die Desulfonierung, mit einer 50mM Tris-HCl-Lösung gewaschen. Die Desulfonierung erfolgt mit 50µl einer 50mM Tris-HCl-  
35 Lösung bei pH9 für 20 Minuten bei 96°C. Nach dreimaligem

Waschen mit je 50µl Wasser sind die Reaktionsgefäße einsatzbereit für eine Amplifikation mittels PCR.

b) Verwenden von Polylysin Slides

- 5 Die Slides (Objektträger) werden zusammen mit den anzu-  
bringenden DNA Molekülen für 3 Minuten bei 42°C in wäss-  
rigem Medium inkubiert. Dabei werden die DNA Moleküle  
gleichmäßig auf der Slide-Oberfläche verteilt. Danach  
10 werden die Slides 10 Sekunden auf einer Heizplatte bei  
einer Temperatur von 150°C inkubiert, wodurch die DNA an  
die Oberfläche gebunden wird. Um nicht gebundene DNA zu  
entfernen werden die Slides dann für 5 Minuten mit NH<sub>4</sub>OH  
gewaschen. Zum Denaturieren werden die Slides anschlie-  
15 bend für 1 Minute bei 95°C (H<sub>2</sub>O) inkubiert und danach  
sofort in 95% EtOH überführt wonach sie getrocknet wer-  
den:

Bisulphit Behandlung:

- Die angebundene DNA wird bei 96°C für 20 Minuten unter  
20 Verwendung eines Adapters in einem Eppendorf-Mastercycler  
denaturiert. Für die Bisulfitreaktion wurde eine Natrium-  
bisulfit-Lösung verwendet. Die Slides wurden bei 50°C in  
einem Eppendorf-Mastercycler für fünf Stunden inkubiert.  
Nach erfolgter Bisulfitreaktion wurden Slides mit Wasser  
25 und, vorbereitend auf die Desulfonierung, mit einer 50mM  
Tris-HCl-Lösung gewaschen. Die Desulfonierung erfolgt mit  
50µl einer 50mM Tris-HCl-Lösung bei pH9 für 20 Minuten  
bei 96°C. Nach dreimaligem Waschen mit je 50µl Wasser  
sind die Reaktionsgefäße einsatzbereit für eine Amplifi-  
30 kation mittels PCR.

**Beispiel 2:**

- 35 Primer Verlängerung (extension) unter Verwendung der DNA  
des Gens p15



Die an einer festen Phase gebundene DNA des Gens p15 (Accession Nummer NM\_004936) diente, nachdem sie wie oben beschrieben mit Bisulphit behandelt wurde, als Ausgangsmaterial für die Primer Verlängerung. Für die Primer Verlängerung wurden 2pmol des Primers mit der Sequenz  
5 GTTAGGTTTTTTAGGAAGGAGAGAGTG (SEQ-ID 1) eingesetzt. Lag an der zu verlängernden DNA an der betreffen Stelle ein Guanin vor, so wurde bei dem verlängerten Primer ein markiertes Cytosin eingebaut (methylierter Zustand); lag dagegen ein Adenin vor, so wurde ein (verschieden) markiertes Thymin eingebaut (nicht methylierter Zustand). Gemäß  
10 Herstellerangaben (Amersham-Pharmacia) wurde ein Dideoxynukleotidgemisch mit jeweils verschieden markierten Nukleotiden für die Extension verwendet. Die Bedingungen  
15 waren: 96°C, 10sec; 55°C, 5sec und 60°C, 10sec. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt. Für die Polylysin Slides erfolgte der Nachweis der verlängerten Sequenz mit dem Scanner Axxon 4000A (Axxon Instruments) unter Benutzung der Software GenePix Pro V. 3.0. Die Durchführung der  
20 Primer Verlängerung im Reaktionsgefäß erfolgte analog.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in  
5 DNA-Proben, dadurch gekennzeichnet, dass die folgenden Verfahrensschritte ausgeführt werden:
  - a) aus einer Probe wird DNA extrahiert,
  - 10 b) die DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit), derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,
  - 15 c) ein oder mehrere Oligonukleotidprimer werden an die behandelte DNA hybridisiert,
  - d) die hybridisierten Primer werden in einer Polymeraseraktion verlängert, wobei markierte Nukleotide im  
20 wesentlichen nur dann eingebaut werden, wenn in der behandelten DNA nach Schritt b) noch Cytosinbasen vorliegen und wobei das Ausmass des Einbaus der markierten Nukleotide zu der Methylierung in der zu untersuchen-  
25 den DNA-Probe korreliert,
  - e) die in der Polymeraseraktion nicht eingebauten markierten Nukleotide werden entfernt,
  - 30 f) die Anzahl der Markierungen in dem durch die Primerverlängerung erzeugten Fragment wird näherungsweise bestimmt, indem eine von diesen Markierungen ausgehende Signalintensität gemessen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt.
- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, 10 Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.
4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Behandlung nach 15 Anspruch 1b) mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA 20 in Agarose oder besonders bevorzugt nach Bindung der DNA an eine Oberfläche erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex 25 denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.
7. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass aus einer Probe genomische DNA extrahiert wird und dabei an eine Oberfläche 30 gebunden wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass diese Bindung durch Hybridisierung an ein immobilisiertes Oligonukleotid erfolgt. 35

9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die extrahierte DNA vor der Bindung durch Restriktionsenzyme gespalten wird.
- 5 10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man an die behandelte DNA mehrere verschiedene Oligonukleotide als Primer hybridisiert.
- 10 11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die markierten Nukleotide Guaninderivate sind, wobei diese in der Polymerasereaktion nur dann wesentlich eingebaut werden, wenn in der DNA Probe an den entsprechenden Positionen Cytosin-Methylierung vorlag.
- 15 12. Verfahren nach Anspruch 11. dadurch gekennzeichnet, dass das Ausmaß des Einbaus der Guaninbasen und damit auch die Anzahl der eingebauten Markierungen proportional zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe.
- 20 13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerasereaktion an der Position bevorzugt endet, die vor der DNA Isolierung durch den Einsatz einer Restriktionsendonuklease geschnitten wurde.
- 25 14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in der Polymerasereaktion nicht eingebauten markierten Nukleotide durch Waschschrte entfernt werden und die DNA an eine Oberfläche gebunden vorliegt.
- 30 15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluor-
- 35

reszenzmarkierungen, Radionuklide, Chemiluminiszenzmarkierungen oder abspaltbare Massenmarkierungen sind, welche in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

5

16. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen indirekt durch Bindung eines wiederum anders markierten Antikörpers nachgewiesen werden.

10

17. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet dass die behandelte DNA-Probe nach Schritt 1b) des Anspruchs 1 unter Verwendung von bevorzugt mindestens zwei Primeroligonukleotiden mittels einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert wird.

15

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die markierten Nukleotide Cytosinderivate sind, wobei diese in der Polymerasereaktion nur dann wesentlich eingebaut werden, wenn in der DNA Probe an den entsprechenden Positionen Cytosin-Methylierung vorlag.

20

19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mehrerer Fragmente in einem Reaktionsgefäß in Form einer Multiplex-PCR durchgeführt wird.

25

20. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Methylierungsstatus von mehr als 10 Methylierungspositionen der zu analysierenden DNA in einem Experiment nachgewiesen wird.

30

21. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bei mindestens einer der

35

Amplifikationen einer der jeweiligen Primer an eine Festphase gebunden ist.

- 5 22. Verfahren nach einem der voranstehenden, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 10 23. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen; wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit;
- 15 Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung;
- 20 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als
- 25 Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
- 30
24. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
- 35

- 25. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, mindestens einem Primer für die Polymerasereaktion, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem der Ansprüche 1-22.

*Fig 1*